



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
NUEVOS AVANCES EN PROCESOS
LEUCÉMICOS: INMUNOHEMATOLOGÍA

Autor: GEMA ISABEL CASARRUBIOS LÁZARO

Tutor: RAFAELA RAPOSO

Convocatoria: JUNIO 2017

ÍNDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 Tratamientos actuales de procesos leucémicos con anticuerpos monoclonales

1.2 Medicamentos quimioterápicos

1.3 Inmunoterapia: linfocitos T-CAR

2. OBJETIVOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

4. RESULTADOS

5.1 Linfocitos T-CAR CD19-específicos

5.2 Linfocitos T-CAR CD20-específicos

5. DISCUSIÓN

6. CONCLUSIÓN

7. BIBLIOGRAFÍA

RESUMEN

Las células T con CAR (Chimeric Antigen Receptor) están emergiendo como poderosas terapias frente a neoplasias hematológicas refractarias a otros tratamientos o recidivantes. Los ensayos clínicos recientes con linfocitos T-CAR, modificados genéticamente y dirigidos frente a dianas específicas como CD19 o CD20, en el tratamiento de leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) y linfomas no Hodgkin (LNH) han mostrado unas tasas de remisión completa (RC) elevadas en pacientes con escasas expectativas terapéuticas. La aparición del síndrome de liberación de citoquinas como efecto adverso es muy común, pero puede revertirse exitosamente. Es necesario seguir investigando en el diseño y producción de células T-CAR con el objetivo de que esta terapia se pueda utilizar más ampliamente.

Palabras clave: células T-CAR CD19, leucemia, inmunoterapia, receptores de antígenos quiméricos.

Key words: Chimeric Antigen Receptor, Immunotherapy, leukemia, T-CAR therapy, B-cell malignancies.

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

En la actualidad, los protocolos de tratamiento más utilizados para tratar las neoplasias hemalógicas consisten en combinar anticuerpos monoclonales (AcMo), como Rituximab, con agentes citostáticos como Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina o Fludarabina. A pesar de ello, la manipulación del sistema inmune se ha convertido en una interesante alternativa terapéutica. Los linfocitos T modificados genéticamente para expresar receptores de antígeno quiméricos (CAR) ofrecen un nuevo enfoque en el tratamiento de estas neoplasias. Al igual que los AcMo, las células T-CAR van dirigidas frente a antígenos expresados en la superficie de células malignas, pero los linfocitos T-CAR son potencialmente más potentes que los AcMo y pueden establecer una inmunidad más duradera frente al antígeno diana tras una única infusión.

1.1 Tratamiento actual de procesos leucémicos con anticuerpos monoclonales

1.1.1 Rituximab (MabThera®)

Es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano, obtenido por ingeniería genética. Se une específicamente al antígeno CD20 que se expresa en los linfocitos B desde el estadio pre-B hasta linfocito B maduro y en tumores de células B.¹

Rituximab está indicado en combinación con quimioterapia en el tratamiento de pacientes con linfoma no-Hodgkin folicular estadio III-IV que no hayan sido tratados previamente; o bien, en monoterapia en pacientes que sean quimiorresistentes.¹

Está indicado en combinación con quimioterapia CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisolona) en el tratamiento de pacientes con linfoma no-Hodgkin difuso de células B grandes (LDCBG) CD20 positivas.¹

Además, está indicado en combinación con quimioterapia en el tratamiento de pacientes con leucemia linfática crónica (LLC), que no hayan sido tratados previamente o que estén en recidiva o refractarios a un tratamiento previo.¹

Las reacciones adversas observadas con mayor frecuencia fueron las reacciones relacionadas con la perfusión (RRP), infecciones y acontecimientos cardiovasculares.¹

1.2 Medicamentos quimioterápicos

La fase de inducción del tratamiento está dirigida a deshacerse de tantas células leucémicas como sea posible. En esta fase, no se destruyen todas las células malignas. Sin tratamiento de consolidación, es probable que la leucemia regrese.²

Posteriormente, en la fase de consolidación se utiliza un tratamiento adicional para destruir células leucémicas remanentes y ayudar a prevenir una recaída. Se

administran varios ciclos de quimioterapia a altas dosis seguidos de un alotrasplante o autotrasplante de progenitores hematopoyéticos.²

1.2.1 Ciclofosfamida

Es un agente antineoplásico alquilante, análogo de la mostaza nitrogenada. Forma puentes inter e intracatenarios en la doble hélice de ADN, provocando interferencias importantes en los procesos de transcripción y replicación del ADN.³

Presenta indicación para el tratamiento de: linfoma de Hodgkin, linfomas no Hodgkin y mieloma múltiple; leucemia linfocítica crónica (LLC) y leucemia linfocítica aguda; leucemia mieloide crónica y leucemia linfoblástica aguda (LLA).³

Las reacciones adversas más frecuentes son mielosupresión, leucopenia, neutropenia, náuseas, vómitos, fiebre y alopecia.³

1.2.2 Vincristina

Afecta a la mitosis celular por la unión o cristalización de proteínas microtubulares críticas del huso mitótico, como tubulina, causando con ello una detención de la división celular durante la metafase y la muerte celular.⁴

Está indicado solo o en combinación con otros fármacos antitumorales para el tratamiento de la leucemia aguda, enfermedad de Hodgkin y linfomas no Hodgkin.⁴

Las reacciones adversas que aparecen con mayor frecuencia son reacciones hematológicas (trombocitopenia, anemia), toxicidad gastrointestinal y alopecia.⁴

1.2.3 Fludarabina

Es un nucleótido fluorado hidrosoluble, análogo de purina. Su metabolito activo inhibe la síntesis de DNA, provocando la muerte celular apoptótica. Está indicado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica de células B en adultos.⁵

Las reacciones adversas más frecuentes son: mielosupresión (neutropenia, trombocitopenia y anemia), infecciones, fiebre, debilidad, náuseas, vómitos y diarrea.⁵

1.2.4 Doxorubicina

Es un antibiótico de antraciclina que ejerce su efecto antineoplásico a través de mecanismos citotóxicos que tienen un efecto perjudicial sobre la síntesis del ADN. Las consecuencias son la mutagénesis y las aberraciones cromosómicas.⁶

Está indicado en enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda y mieloma múltiple avanzado.⁶

Presenta una toxicidad hematológica o mieloide que cursa con fiebre, infecciones, sepsis, choque séptico, hemorragias, hipoxia tisular o muerte. En casi todos los pacientes se observan náuseas y vómitos, así como alopecia.⁶

1.3 Inmunoterapia: linfocitos T-CAR

1.3.1 Bases inmunológicas

El linfocito T inspecciona células sospechosas para comprobar si en su superficie presentan dos moléculas necesarias para que se produzca el ataque. La primera es el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que contiene un fragmento proteico, o antígeno, y es la diana que las células dendríticas presentan a los linfocitos T. La segunda es el ligando coestimulador que constituye la señal necesaria para que se produzca el ataque. Si el complejo antígeno-MHC y el ligando coestimulador no concurren, el linfocito no lleva a cabo el ataque inmunológico. Por tanto, las células malignas disponen al menos de dos estrategias para evadir al sistema inmune: cesar de producir las moléculas MHC en su superficie o presentar en ella una variante aberrante del ligando coestimulador que desactive los linfocitos T.⁷

1.3.2 Diseño de linfocitos T-CAR

Lo que se buscaba era modificar genéticamente los linfocitos T para que fuese el investigador quien escogiese el antígeno diana, por ejemplo uno que abunde en las células tumorales pero que no sea presentado por el MHC; y además, conseguir que los linfocitos no tuviesen que pasar por las dos etapas normales para atacar a las células tumorales. Solo con las técnicas basadas en los linfocitos T-CAR se pudo intentar esto con perspectivas de éxito.⁷

La solución, en principio, consistió en dotar a los linfocitos T de genes que diesen lugar a una molécula sintética (CAR, Chimeric Antigen Receptor) que pudiese hacer dos cosas a la vez: detectar el antígeno seleccionado y activar el linfocito T, sin las señales habituales. Tal objetivo se hacía posible si se combinaban elementos de los anticuerpos con proteínas estimuladoras de los linfocitos T. En concreto, la parte exterior del CAR se diseñó como un anticuerpo, que sobresalía de la superficie celular y era capaz de unirse al antígeno tumoral escogido. La parte restante, constaba de un dominio transmembrana y un dominio intracelular capaz de activar al linfocito tan pronto como se detectase el antígeno.⁷

Se decidió aprovechar la consabida predilección del VIH por los linfocitos T. Se eliminaron los genes patógenos y se sustituyeron por otros provistos de la información necesaria para la quimera de anticuerpo y activador. A continuación, se permitió que las partículas de VIH inocuas infectasen a los linfocitos T extraídos de los pacientes. De este modo, los virus alterados introdujeron los genes en el interior de las células;

permitiendo así, que los linfocitos T fabricaran los CAR y los llevaran hasta su superficie. Gracias a esta técnica, se ha logrado remodelar los linfocitos T para que ataquen a las células tumorales sin otro requisito que el de reconocer a una molécula de su superficie, sin la intermediación del MHC ni del ligando coestimulador.⁷

1.3.3 Diana de los linfocitos T-CAR

Ciertos tipos de leucemia y linfoma surgen a partir de los linfocitos B. A pesar de que estas células son las responsables de generar anticuerpos, los seres humanos pueden vivir sin ellas si de vez en cuando se suministran anticuerpos prefabricados.⁷

El linfocito B, al igual que cualquier célula maligna en la que se pueda convertir, porta en su superficie la proteína CD19. Se considera que la CD19 puede ser una diana interesante para la terapia con los linfocitos T-CAR, puesto que no se haya en ningún otro tejido sano⁷ y permite así minimizar su toxicidad potencial.⁸

1.3.4 Estructura de los CAR

Un CAR (Chimeric Antigen Receptor) está constituido por un anticuerpo monoclonal, que reconoce un antígeno, unido al dominio de señalización intracelular.⁹

Este receptor de antígeno, construido mediante tecnología recombinante, está formado por un dominio extracelular, que es un anticuerpo monoclonal en formato scFv (fragmentos variables de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina en una sola cadena) unido a un dominio transmembrana, que a su vez se une a uno o más dominios intracelulares de señalización de células T.¹⁰

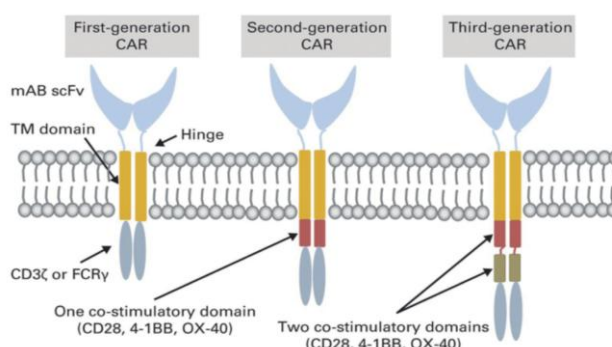
Una vez expresados en las células T, los CAR dirigen su antígeno-especificidad hacia antígenos expresados en la superficie de células tumorales. La terapia con CAR aporta a las células T una actividad citotóxica MHC-independiente y una coestimulación imparcial para ligandos expresados por células tumorales.⁸ Combinando así, la especificidad de un anticuerpo con las funciones de citotoxicidad y memoria de las células T.¹¹

1.3.5 Evolución de los linfocitos T-CAR

El primer diseño de un CAR fue hace más de 15 años.¹⁰ Los CAR de primera generación estaban formados por un dominio de reconocimiento antigénico (scFv) unido a un dominio de señalización citoplasmático derivado de CD3- ζ o de la porción constante de una inmunoglobulina (FcR- γ).⁹ Se basaba exclusivamente en la señalización a través de CD3 y su eficacia clínica fue muy pobre.¹⁰ Aunque estos CAR se unían eficazmente a sus antígenos diana, tenían una limitada capacidad de

proliferación y escasa capacidad citotóxica debido a la carencia de moléculas de coestimulación.⁹

Por ello, en la segunda generación de CAR se incorporaron, en la porción intracelular del receptor quimérico, dominios de coestimulación (como CD28 o 4-1BB). De esta manera, se consigue tanto mejorar la persistencia de las células *in vivo* como su actividad citotóxica. Se han construido diferentes CAR de segunda generación, algunos que incorporan CD28 y otros 4-1BB, aunque no hay estudios claros que determinen cuál de los dos es mejor. A diferencia de los CAR de primera generación, los CAR de segunda generación han mostrado buenos resultados en distintos ensayos clínicos.⁹



Un paso más, son los CAR de tercera generación, que incorporan en el dominio citoplasmático dominios de 2 moléculas de coestimulación en tándem,⁹ que permiten aumentar la función efectora de las células T modificadas.¹⁰ Estos nuevos CAR se han probado en modelos preclínicos, pero la experiencia es aún muy limitada en ensayos clínicos.⁹

Además, en la actualidad se están diseñando CAR de tercera generación con doble especificidad antigénica o CAR duales, que incluyen dominios estimuladores e inhibidores para evitar la toxicidad secundaria al reconocimiento de la diana expresada en células no tumorales.¹⁰

1.3.6 Proceso de elaboración de los linfocitos T-CAR

En general, el proceso de fabricación y suministro de células T-CAR integra varios pasos. En primer lugar, se realiza una leucoféresis en la que se recogen y aíslan las células T del paciente mediante aféresis. A continuación, se lleva a cabo la activación de los linfocitos T aislados con microesferas recubiertas de anticuerpos que actúan como células dendríticas artificiales. Una vez activadas, se procede a la transducción, donde las células son genéticamente reprogramadas *ex vivo* introduciendo la estructura codificada del CAR mediante lentivirus. Las células T genéticamente reprogramadas son sometidas a una posterior expansión *ex vivo*.¹¹

De forma previa a la infusión de células T-CAR, los pacientes reciben un tratamiento preparatorio de linfosupresión. Por último, se realiza la infusión de linfocitos T-CAR genéticamente manipulados al paciente.¹¹

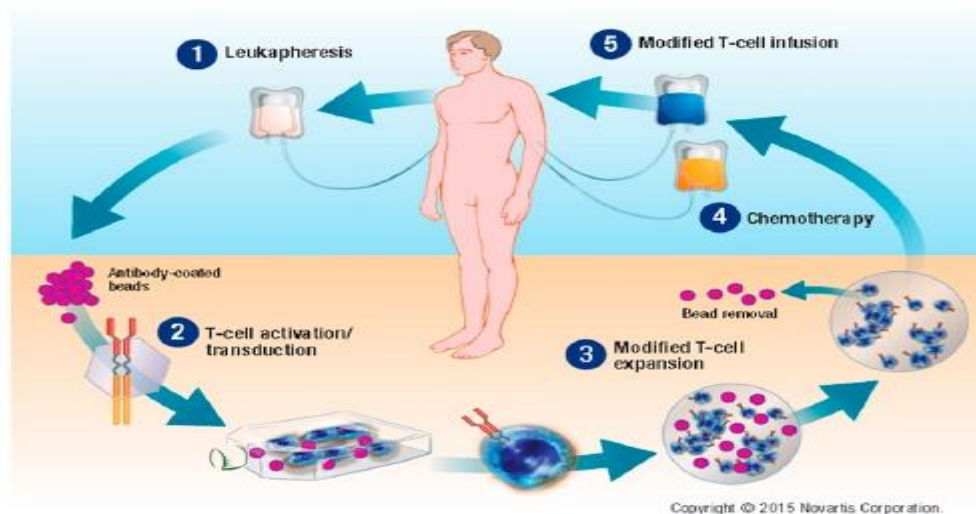


Ilustración 1. Proceso de elaboración de linfocitos T-CAR

1.3.7 Toxicidad de la terapia con linfocitos T-CAR

La regresión del tumor en respuesta a los T-CAR va acompañada de toxicidades. Existen dos motivos responsables de esta toxicidad. El primero se debe a que los T-CAR son incapaces de distinguir entre las células tumorales y las células normales que comparten el mismo antígeno al que van dirigidos. El segundo está relacionado con la alteración del sistema inmune, provocando lo que se conoce como síndrome de liberación de citoquinas, se trata de una respuesta inflamatoria sistémica producida como consecuencia de la rápida y robusta expansión *in vivo* de los linfocitos T-CAR.⁸

La aplasia de células B inducida por los T-CAR CD19-específicos era esperada puesto que el antígeno CD19 está homogéneamente expresado linfocitos B tanto normales como malignos.⁸

El síndrome de liberación de citoquinas es una condición clínica caracterizada por fiebre e hipotensión, que en casos severos genera un fallo multiorgánico. Dicha toxicidad se correlaciona con la expansión *in vivo* de los T-CAR infundidos, hecho que causa una perturbación general del sistema inmune y una liberación excesiva de citoquinas pro-inflamatorias, como el TNF- α y la IL-6. Bloqueando los receptores de IL-6 con el anticuerpo monoclonal Tocilizumab (anti-IL-6) y los de TNF α con Etanercept, se ha conseguido controlar exitosamente los casos severos de este síndrome,⁸ sin impedir la expansión de células T-CAR ni reducir la eficacia antileucémica.¹²

2. OBJETIVOS

1. Descripción del impacto de la terapia con linfocitos T-CAR en la remisión completa, la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes.
2. Comparativa de la terapéutica actual frente a la terapia con linfocitos T-CAR, en cuanto a los resultados de remisión completa de la enfermedad, supervivencia y calidad de vida obtenidos.
3. Valoración de los obstáculos y las perspectivas de futuro de la terapia con linfocitos T-CAR.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica extensa del tema tratado utilizando diversas fuentes de información. Se han consultado diferentes artículos de investigación clínica de publicación reciente, bases de datos, libros de texto, revistas científicas y páginas web con el fin de obtener la información más actualizada posible. La lista completa de las fuentes consultadas está disponible en el apartado de bibliografía.

4. RESULTADOS

La terapia con linfocitos T-CAR ha tenido un gran impacto clínico especialmente en las malignizaciones linfoides.⁸

Esta terapia ha mostrado una eficacia importante en poblaciones de pacientes con enfermedad avanzada refractaria a otros tratamientos o recidivante. Por el momento, estos pacientes son los más apropiados para ser incluidos en los ensayos clínicos con células T-CAR.¹¹

4.1 Linfocitos T-CAR CD19-específicos

Dentro de los estudios con células T-CAR, la terapia con linfocitos T-CAR CD19-específicos es la que tiene un desarrollo clínico más amplio.¹³

4.1.1 Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)

La sorprendente actividad clínica de las células T-CAR CD19-específicas fue demostrada por primera vez por investigadores de la Universidad de Pensilvania en 3 pacientes de alto riesgo con leucemia linfocítica crónica severamente pretratados. Los tres pacientes respondieron a la terapia con linfocitos T-CAR CD19, incluso 2 de ellos lograron una remisión completa (RC) que todavía permanece más de cuatro años después de la infusión con linfocitos T-CAR.¹³

Un largo período de seguimientos a pacientes con leucemia linfocítica crónica ha demostrado que las células T-CAR CD19-específicas con un dominio de coestimulación 4-1BB proliferan sustancialmente *in vivo*, eliminan la voluminosa enfermedad y establecen memoria durante años. En este estudio, 8 de 14 pacientes (57%) respondieron, incluyendo 4 con remisión completa (RC) y 4 con remisión parcial (RP). Cabe destacar que ningún paciente con RC ha recaído.¹³

Más de 45 pacientes con recaídas o LLC refractaria han sido tratados en esta universidad con una tasa de respuesta global del 45%, alcanzando una RC en un 21% de los pacientes, una RP en otro 21% y el 70% de los pacientes obtuvieron una respuesta duradera >9 meses.^{11,23}

Nueve pacientes desarrollaron el síndrome de liberación de citoquinas (SLC) entre los días 1 y 14 después de la infusión de células T-CAR. 5 de ellos recibieron terapia anti-citoquinas dirigida, mientras que los otros 4 precisaron de cuidados intensivos en la UCI.¹³

Parámetros de respuesta	LLC	LLC refract./recidiv.
Remisión completa (RC)	28,57%	21%
Remisión parcial (RP)	28,57%	21%
Tasa de respuesta global (ORR)	57%	45%
Recaída tras RC	No	No
Síndrome de liberación de citoquinas (SLC)	—	20%

Tabla 1. Resultados de la terapia con T-CAR en pacientes con LLC

Parámetros de respuesta	Linfocitos T-CAR	Terapia R-FC	Terapia FC
Tasa de respuesta Global (ORR)	57%	85,8%	72,6%
Remisión Completa (RC)	28,57%	36%	16,9%
SLP	> 4 años	4 años	< 4 años
Reacciones adversas	SLC	RRP, infecciones, neutropenia, leucopenia, trombocitopenia	mielosupresión, infecciones

Tabla 2. Comparación de la terapia con T-CAR anti-CD19 frente a otros tratamientos de 1ª línea en LLC

Abreviaturas: FC: quimioterapia con Fludarabina y Ciclofosfamida; SLC, síndrome de liberación de citoquinas; SLP, supervivencia libre de progresión; R-FC: terapia combinada de Rituximab (AcMo), Fludarabina, Ciclofosfamida; RRP, reacciones relacionadas con la perfusión.

4.1.2 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

Varios grupos de investigación usando diferentes diseños de células T-CAR han demostrado altas tasas de RC en pacientes con leucemia linfoblástica aguda refractaria/recidivante (r/r).¹³

El Hospital Infantil de Philadelphia (HlPh) y la Universidad de Pensilvania (U.Pen) han presentado los resultados de 30 pacientes (25 pediátricos y 5 adultos) con LLA refractaria/recidivante (r/r) tratados con linfocitos T-CAR CD19-específicos con un dominio de coestimulación 4-1BB.¹¹ La RC fue lograda en 27 pacientes (90%), incluyendo 15 que había recibido trasplante de células madre previamente. El sexto mes, la probabilidad de persistencia de los T-CAR y la tasa de supervivencia global (TSG) fue 68% y 78% respectivamente. Una remisión duradera fue observada pasados los 24 meses y se correlaciona con la persistencia de las células T-CAR.¹³

Todos los pacientes experimentaron un síndrome de liberación de citoquinas, el cual fue severo en el 27% de los pacientes, habitualmente asociado a la elevada carga de preinfusión y eficazmente tratado con Tocilizumab.¹³

Una reciente actualización, que incluye pacientes con edades comprendidas entre los 4 y los 24 años de edad con LLA r/r, presenta una tasa de RC del 93%, varias de estas remisiones completas se mantienen pasados 3 años post-infusión.¹¹

The National Cancer Institute (NCI) trató a pacientes pediátricos, con LLA refractaria/recidivante, mediante células T-CAR CD19-específicas con un dominio de coestimulación CD28, obteniendo una tasa de RC del 70%.¹¹ En el momento del análisis todos los pacientes permanecían vivos y un 88,9% se mostraron libres de enfermedad (DFS) (rango 5-28 meses). Sin embargo, la inmensa mayoría de los pacientes que respondieron con una RC experimentaron un trasplante alogénico de células madre, probablemente debido a que la persistencia media de los T-CAR fue de 2 a 3 meses, lo que iba seguido de una rápida recuperación de células B.¹³

En el 14% de los pacientes se observó un síndrome de liberación de citoquinas (SLC) de grado 4.¹¹

The Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) ha inducido la remisión completa de la enfermedad (RC) en 29 de 32 pacientes adultos con LLA refractaria/recidivante, tras ser tratados con células T-CAR CD19-específicas con un dominio de coestimulación CD28. En pacientes pediátricos, la remisión completa se consiguió en 2 de 4 pacientes (50%) con LLA refractaria/recidivante.¹¹ La permanencia

de estos linfocitos T-CAR es de 1 a 3 meses, lo que conduce a que el 77% de los pacientes respondedores procedan a un trasplante alogénico de células madre (TCM).^{11/13} La supervivencia libre de enfermedad (DFS) > 1 año fue observada en 30% de los pacientes con LLA r/r tratados con linfocitos T-CAR anti-CD19 CD28.¹¹

Cabe destacar que solo la mitad de los pacientes presentaban una enfermedad morfológicamente detectable ($\geq 5\%$ de blastos en médula ósea) de forma previa a la infusión, pero más del 80% alcanzó una enfermedad mínima residual (EMR) negativa después de la terapia con células T-CAR. Mientras que un trasplante alogénico de células madre previo no parece comprometer la obtención de RC tras la terapia con células T-CAR, el logro de un estado negativo de enfermedad mínima residual post-infusión fue altamente predictivo de la supervivencia.¹³

En algunos análisis, el síndrome de liberación de citoquinas (SLC) fue observado en todos los pacientes pediátricos tratados con células T-CAR anti-CD19 CD28. En pacientes adultos con LLA r/r, el SLC se asoció con la carga tumoral, y ninguno de los pacientes con enfermedad mínima residual en el momento de la infusión de T-CAR experimentó el síndrome de liberación de citoquinas (SLC).¹¹

Fred Hutchinson Cancer Research Center (FRCRC) trató a 29 pacientes con linfocitos T-CAR CD19-específicos con un dominio de coestimulación 4-1BB. Como resultado, se obtuvo una remisión completa (RC) en 27 de los 29 pacientes (93%) con LLA refractaria/recidivante y 25 de ellos (86%) no presentaban evidencia de enfermedad mínima residual (EMR).¹³ Solo los pacientes con una alta carga tumoral sufrieron el síndrome de liberación de citoquinas y uno de ellos murió por eventos relacionados con este síndrome.¹¹

Tras la infusión de células T-CAR CD19-específicas con un dominio de coestimulación 4-1BB en 29 pacientes con LLA refractaria/recidivante, 27 de ellos (93%) consiguieron una remisión completa (RC) y 25 (86%) no presentaban evidencia de enfermedad mínima residual (EMR).¹³

En ensayos clínicos realizados en el Hospital Infantil de Seattle (HIS) con linfocitos T-CAR con un dominio de coestimulación 4-1BB, se indujo una enfermedad mínima residual negativa y se obtuvo una RC en 20 de 22 pacientes pediátricos (91%) con LLA refractaria/recidivante. El síndrome de liberación de citoquinas se observó en todos los pacientes pediátricos respondedores.¹¹

Institución académica	Dominio de coestimulación	Estado de la enfermedad	RC	Otros parámetros de respuesta	Seguridad
HIPh y U.Pen	4-1BB	LLA r/r pediátrica	93%	TSG 78% Varios pacientes remisión > 1 año	SLC 100% pacientes 27% SLC severo
NCI	CD28	LLA r/r pediátrica	70%	DFS 88,9%	14% SLC severo
MSKCC	CD28	LLA r/r adultos	91%	DFS >1año 30% 80% EMR negativa	0% con EMR en el momento de infusión desarrollaron SLC
		LLA r/r pediátrica	50%		SLC 100% pacientes
FRCRC	4-1BB	LLA r/r adultos	93%	86% EMR negativa	1 paciente murió por SLC
HIS	4-1BB	LLA r/r pediátrica	91%	ORR 92%	SLC en todos los respondedores

Tabla 3. Resultados de la terapia con linfocitos T-CAR anti-CD19 en LLA

Abreviaturas: DFS, supervivencia libre de enfermedad; EMR, enfermedad mínima residual; FRCRC, *Fred Hutchinson Cancer Research Center*; HIPh, Hospital Infantil de Philadelphia; HIS, Hospital Infantil de Seattle; LLA r/r, leucemia linfoblástica aguda refractaria/recidivante; MSKCC, *The Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*; NCI, *The National Cancer Institute*; ORR, tasa de respuesta global; RC, remisión completa; SLC, síndrome de liberación de citoquinas; TSG, tasa de supervivencia global; U.Pen, Universidad de Pensilvania.

4.1.3 Linfoma de células B

La terapia con linfocitos CD19 también es activa en pacientes altamente pretratados y CD19-positivos.¹³

En el *Nacional Cancer Institute* (NCI), 15 pacientes con malignidades avanzadas de células B fueron tratados con una única dosis de células T-CAR anti-CD19 con un dominio de coestimulación CD28, después de haber recibido altas dosis de quimioterapia linfo-supresora con Ciclofosfamida y Fludarabina. 9 pacientes presentaban linfoma difuso de células B grandes (LDCBG), 2 padecían linfoma no Hodgkin indolente (LNHi) y 4 pacientes LLC.^{10,11}

La tasa de respuesta global (ORR) fue del 80% (LDCBG 67%, LNHi 100%, LLC 100%) 8 RC y 4 RP entre los 13 pacientes evaluables. 3 de 4 RC en LBDCG refractaria/recidivante fueron permanentes y su duración osciló los 9-22 meses. El nivel máximo de células T-CAR en sangre periférica se produjo dentro de los 15 días tras la infusión y fueron detectables hasta 75 días después de la misma.^{10,13}

En el NCI se trataron 8 pacientes de LDCBG refractaria/recidivante únicamente con linfocitos T-CAR anti-CD19 CD28 a dosis bajas, obteniendo una tasa de respuesta global (ORR) del 63% (5/8) y una RC del 13% (1/8). La duración de la respuesta en estos pacientes oscila desde 1 a más de 7 meses. Los principales problemas de seguridad asociados al uso de T-CAR anti-CD19 a bajas dosis fue la neurotoxicidad a corto plazo.¹¹

Los investigadores de la Universidad de Pensilvania (U.Pen) han presentado un ensayo clínico en fase II en el que 30 pacientes muy pretratados con linfoma no Hodgkin (LNH) refractario o recidivante (15 LDCBG, 13 linfoma folicular, 2 linfoma de células del manto) recibieron un protocolo específico con linfocitos T-CAR anti-CD19 con un dominio de coestimulación 4-1BB. La tasa de respuesta global (ORR) fue del 47% en LDCBG (6 RC, 1 RP) y del 73% en linfoma folicular (7 RC, 1 RP), mientras que solo 1 paciente con linfoma de células del manto obtuvo una respuesta que perduró durante 50 días post-infusión.¹³

La duración de la respuesta clínica en este estudio fue de más de 350 días para el linfoma folicular (LF) y aproximadamente 400 días para LDCBG.¹¹ En el momento del análisis, la supervivencia libre de progresión (SLP) alcanzó los 90 días (rango 7-400 días). Solo 2 pacientes desarrollaron el síndrome de liberación de citoquinas.¹³

También se ha observado actividad clínica usando células T-CAR anti-CD19 en LNH de células B agresivo tras un trasplante autólogo de células madre, donde 5 de 8 pacientes (63%) alcanzaron una remisión completa.¹³

Los estudios realizados por *The Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (MSKCC) con células T-CAR CD19-específicas con un dominio de coestimulación CD28 y por el *Fred Hutchinson Cancer Research Center* (FRCRC) con linfocitos T-CAR anti-CD19 con un dominio de coestimulación 4-1BB fueron eficaces en pacientes con linfoma no Hodgkin (LNH) refractario/recidivante. Pero solo 1 paciente de 9 (11%) alcanzó una RC tras el tratamiento con linfocitos T-CAR anti-CD19 con un dominio de coestimulación 4-1BB.^{11,13}

Institución académica	Dominio de coestimulación	Estado de la enfermedad	RC	Otros parámetros de respuesta	Seguridad
NCI	CD28	LDCBG r/r	57%	ORR 67%	
		LDCBG (tto. a bajas dosis)	13%	ORR 63%	Neurotoxicidad a corto plazo
U.Pen	4-1BB	LDCBG r/r	40%	ORR 47%	SLC en 7% pacientes
		LF r/r	54%	ORR 73%	
FRCRC	4-1BB	LNH r/r	11%	ORR 67%	SLC no severo
MSKCC	CD28	LNH r/r		SLP 100%	SLC grado 3-4

Tabla 4. Resultados de la terapia con linfocitos T-CAR anti-CD19 en linfomas de células B.

Abreviaturas: FRCRC, *Fred Hutchinson Cancer Research Center*; LDCBG, linfoma difuso de células B grandes, LF, linfoma folicular; LNH, linfoma no Hodgkin; MSKCC, *The Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*; NCI, *The National Cancer Institute*; ORR, tasa de respuesta global; RC, remisión completa; r/r; refractaria/recidivante; SLC, síndrome de liberación de citoquinas; SLP, supervivencia libre de progresión; U.Pen, Universidad de Pensilvania.

Linfoma no Hodgkin folicular refractario/recidivante			
	Terapia con T-CAR	Terapia R-CHOP	Terapia CHOP
ORR	73%	87%	74%
RC	54%	29%	16%
Linfoma no Hodgkin difuso de células B grandes			
	Terapia con T-CAR	Terapia R-CHOP	Terapia CHOP
RC	57%	76%	62%

Tabla 5. Comparación de la terapia con T-CAR anti-CD19 frente a otros tratamientos de 1ª línea en linfoma de células B.

Abreviaturas: ORR, tasa de respuesta global; RC, remisión completa; R-CHOP, terapia combinada de Rituximab con Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina, Prednisona; CHOP, quimioterapia con Ciclofosfamida, Doxorubicina, Vincristina, Prednisona.

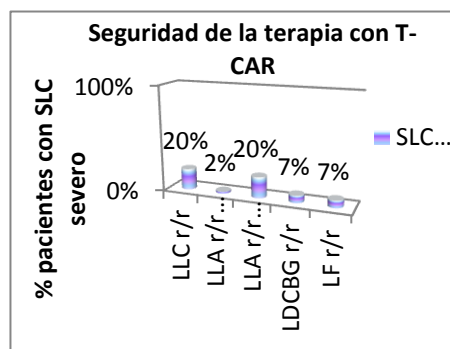
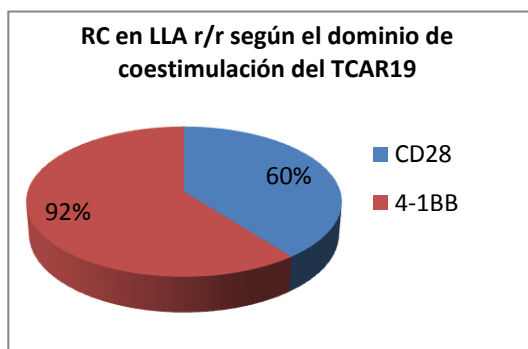
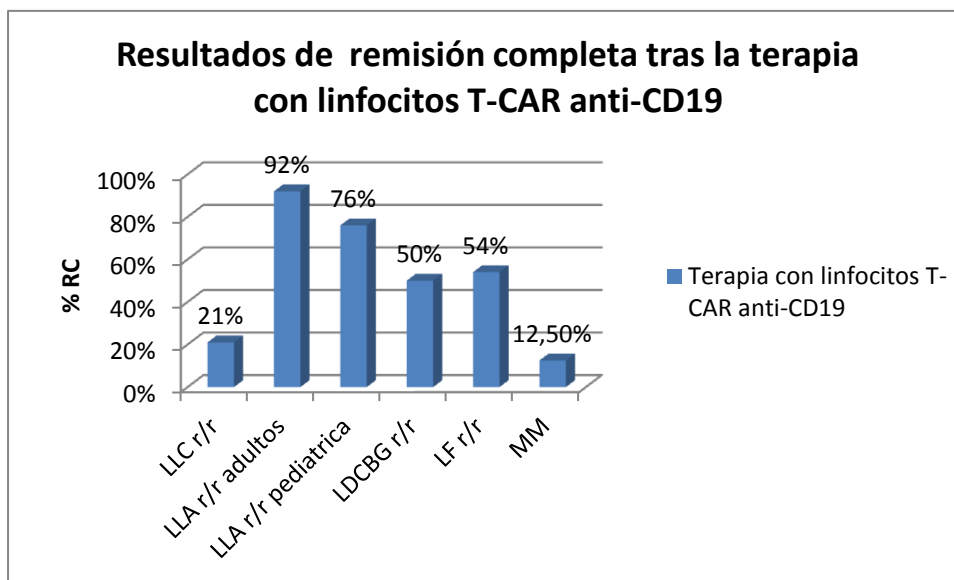
4.1.4 Mieloma múltiple

Células T-CAR anti-CD19 han sido administradas después de un trasplante autólogo de células madre a 10 pacientes en la Universidad de Pensilvania, de los cuales 8 fueron accesibles para ser evaluados. De ellos, 1 alcanzó la RC (perduró pasados 12 meses post-trasplante), 3 tuvieron una RP (en todos persistente) y 4 experimentaron una enfermedad progresiva.¹³

El mecanismo terapéutico de acción de los linfocitos T-CAR CD19-específicos en mieloma múltiple es de momento desconocido pero podría estar relacionado con la

focalización de la extraña expresión del CD19 en los precursores del mieloma y/o la directa eliminación de las células B CD19-positivas no malignas con capacidades para promover el mieloma.¹³

4.1.5 Resumen gráfico de los resultados en las distintas patologías



4.2 Linfocitos T-CAR CD20-específicos

Bajo la premisa de que CD20 es también una diana ideal para el tratamiento de la LNH, se han diseñado linfocitos T-CAR anti-CD20.¹⁰

Primero se llevó a cabo un estudio piloto en 3 pacientes con neoplasias hematológicas diferentes a LDCBG, en el que se demostró la actividad antitumoral *in vivo* de células T-CAR anti-20. Tras estos primeros resultados, se ha evaluado la eficacia de estas células en LDCBG. En el trabajo publicado por Wang y cols.²¹ se demuestra que el tratamiento con células T-CART CD20-específicas en combinación con acondicionamiento con quimioterapia resultó en regresiones tumorales de 3 a 6 meses en 4 de 5 pacientes evaluables. Un paciente, caracterizado como de alto riesgo y

con un mal pronóstico, experimentó una RC de 14 meses duradera y permanente tras una sola infusión de CAR-T.¹⁰

5. DISCUSIÓN

Las células T-CAR anti-CD19 son altamente activas en la leucemia linfocítica crónica, ya que pueden inducir altas tasas de respuesta y remisiones completas de alta duración en pacientes con un pronóstico malo y que han fallado previamente a otros tratamientos con quimioterapia (Ciclofosfamida y Fludarabina); o bien, quimioterapia combinada con un anticuerpo monoclonal (Rituximab).

Observando los datos recopilados en la tabla 2, podemos afirmar que los parámetros de respuesta obtenidos no son significativamente superiores a los que se obtienen tras el tratamiento combinado con Rituximab, Ciclofosfamida y Fludarabina. Sin embargo, la remisión completa de la leucemia linfocítica crónica observada en los pacientes tratados con linfocitos T-CAR CD19-específicos es considerablemente superior a la obtenida tras el tratamiento con quimioterápicos únicamente (Ciclofosfamida y Fludarabina).

Por lo tanto, se puede deducir que, aunque por el momento la terapia con linfocitos T-CAR no se encuentre en primera línea, podría ser la opción terapéutica más aconsejable para aquellos pacientes con LLC que se presenten refractarios al uso de otros fármacos, bien sean quimioterápicos o anticuerpos monoclonales.

Un dato importante a destacar es que la remisión completa alcanzada por los pacientes con LLC refractaria tratados con T-CAR es muy duradera en el tiempo, lo que permite reducir notablemente el número de pacientes con recaídas. Esto se debe a que los linfocitos T-CAR infundidos perduran durante largos períodos en los pacientes.

En pacientes con LLA (tabla 3), la transferencia de células T-CAR CD19-específicas presenta una sensibilidad única, ya que los parámetros de respuesta a este tratamiento son mejores respecto al resto de patologías estudiadas.

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios con LLA r/r, tanto en adultos como en niños, son verdaderamente esperanzadores; ya que el número de pacientes que consiguen una remisión completa de la enfermedad es muy alto ($\approx 92\%$). Esta remisión es duradera en el tiempo, como podemos observar atendiendo a los datos de supervivencia libre de enfermedad durante más de un año en varios pacientes. Este hecho es muy destacable, puesto que los pacientes con LLA refractaria/recidivante no

tratados con T-CAR presentan una supervivencia global de pocos meses, debido a la rápida progresión y agresividad de esta enfermedad.

La presencia de enfermedad mínima residual (EMR) en LLA es un marcador pronóstico significativo para la detección temprana de recaídas. Como los datos de EMR (tabla 3) son negativos en un alto porcentaje de pacientes, podemos deducir que la terapia con linfocitos T-CAR permite evitar las recaídas de la enfermedad, gracias a la prolongada duración de los mismos.

Como inconveniente para pacientes con LLA destaca el tiempo que se tarda en recolectar, modificar genéticamente y expandir los linfocitos T-CAR CD19-específicos, que puede ser demasiado largo y traer como consecuencia la muerte del paciente antes de que pueda ser tratado en el ensayo, esto se debe a la progresión rápida de la enfermedad.

En los pacientes pediátricos con LLA r/r tratados con linfocitos T-CAR anti-CD19 con un dominio de coestimulación 4-1BB en vez de CD28 (Tabla 3), presentan mayor probabilidad de conseguir remisión completa.

En pacientes con LDCBG r/r tratados con células T-CAR CD19-específicas (tabla 5), no se aprecian diferencias significativas a favor respecto al tratamiento con quimioterapia (CHOP) o combinado junto a Rituximab (R-CHOP). En estos pacientes, se llevó a cabo otro estudio con linfocitos T-CAR anti-CD20 con resultados esperanzadores, quizás para esta patología deba abrirse una nueva línea de investigación en búsqueda de nuevas dianas específicas diferentes a CD19.

En el caso del linfoma folicular r/r, sí se obtienen unos buenos resultados de respuesta respecto al tratamiento con quimioterapia (CHOP) o con un anticuerpo monoclonal asociado a la quimioterapia (R-CHOP), con una RC en el 54% de los pacientes tratados con T-CAR.

Resulta necesario llevar a cabo una investigación más larga para determinar la duración de esta remisión lograda con células T-CAR e incrementar las tasas de RC en estos pacientes con LNH r/r.

En cuanto a los resultados obtenidos en el tratamiento del mieloma múltiple, podemos señalar que resultan, de momento, carentes de una respuesta clínica significativa. Por lo tanto, se debe seguir investigando por esta rama para dar con unos linfocitos T-CAR más eficaces frente a esta patología.

Por último, es preciso señalar que todos los estudios recopilados de las diferentes patologías estudiadas coinciden en la aparición del síndrome de liberación de

citoquinas. Este síndrome lo experimentan con mayor severidad los pacientes con LLA r/r y LLC r/r (20% de los pacientes).

Aunque en varios casos este síndrome resulta severo y compromete la seguridad de la terapia con T-CAR, existen anticuerpos monoclonales anti-IL6 (Tocilizumab) y anti-TNF α (Etanercept) que permiten controlar eficazmente este efecto adverso asociado a la infusión de células T-CAR.

6. CONCLUSIÓN

La fusión de la terapia génica, la terapia celular y la inmunoterapia muestran resultados muy prometedores para el futuro del tratamiento y la cura potencial de pacientes con neoplasias hematológicas avanzadas.

La inmunoterapia con células T-CAR dirigidas frente a CD19 se ha mostrado prometedora en pacientes con leucemias refractarias o recidivantes y en linfomas no Hodgkin agresivos, refractarios o recidivantes.

En el caso de la LLA r/r, los estudios muestran unas tasas de remisión completa muy elevadas; pero también una alta proporción de pacientes con síndrome de liberación de citoquinas, que requieren una terapia anti-citoquinas.

En cuanto a los resultados en LNH r/r, muestran una mayor tolerancia a la infusión de linfocitos T-CAR pero unas tasas de respuesta más bajas.

Estos resultados dejan lugar al optimismo, ya que los parámetros de respuesta observados son más favorables que los obtenidos con la quimioterapia convencional. Sin embargo, es necesario continuar por esta línea de investigación con el fin de mejorar el diseño y la obtención de los T-CAR e incrementar así, las tasas de respuesta y mejorar el perfil de seguridad de la terapia con células T-CAR.

Resulta necesario llevar a cabo estudios que amplíen las expectativas en busca de nuevas dianas. Actualmente se están llevando a cabo ensayos en pacientes con MM con T-CAR dirigidos frente a CS-1, BCMA y CD138, en pacientes con LMA (CAR frente a CD33 y CD123), Hodgkin (CD30), y LNH (CD22, ROR1).⁹

Así mismo, deben realizarse ensayos más prolongados en el tiempo para demostrar si estas perspectivas curativas con linfocitos T-CAR son reales y duraderas en el tiempo. Teniendo como objetivo que esta terapia con T-CAR pueda ser aplicable en un futuro próximo como tratamiento de primera línea en monoterapia o combinado con otras inmunoterapias.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Rituximab. Ficha técnica o resumen de las características del producto. [Consultado en Abril 2017]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000165/WC500025821.pdf
2. Cancer.org [Internet]. Estados Unidos: American Cancer Society c2015 [Consultado en Abril 2017]. Tratamiento típico para la mayoría de los tipos de leucemia mieloide aguda (excepto promielocítica M3 aguda). Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-mieloide-aguda/tratamiento/tratamiento-tipico-de-la-leucemia-mieloide-aguda.html>
3. Ciclofosfamida. Ficha técnica o resumen de las características del producto. [Consultado en Abril 2017]. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/48972/FT_48972.pdf
4. Vincristina. Ficha técnica o resumen de las características del producto. [Consultado en Abril 2017]. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/cima/dochtml/ft/62378/FichaTecnica_62378.html#4-8-reacciones-adversas
5. Fludarabina. Ficha técnica o resumen de las características del producto. [Consultado en Mayo 2017]. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/cima/dochtml/ft/60616/FichaTecnica_60616.html#4-8-reacciones-adversas
6. Doxorubicina. Ficha técnica o resumen de las características del producto. [Consultado en Mayo 2017]. Disponible en: https://www.aemps.gob.es/cima/dochtml/ft/73266/FichaTecnica_73266.html#5-propiedades-farmacologicas
7. Avery D. Posey Jr., Carl H. June y Bruce L. Levine. Una nueva arma contra el cáncer. Investigación y Ciencia. Mayo 2017. [Consultado en Mayo 2017] N° 488: 29-33.
8. Claudia Geldres, Barbara Savoldo, Gianpietro Dotti. Chimeric antigen receptor-redirected T cells return to the bench. Seminars in Immunology. 2015. [Consultado en Mayo 2017]. 1-7.
9. Javier Briones. Inmunoterapia de las hemopatías malignas: de los monoclonales a las células CART. LVIII Congreso Nacional de la SEHH / XXXII Congreso Nacional de la SETH. Programa Educativo. 2016. [Consultado en Mayo 2017]. 53-56.
10. S. Inogés Sancho, A. López Díaz de Cerio. Nuevas aproximaciones inmunoterapéuticas en el LDCBG: anticuerpos biespecíficos, terapia celular mediada por linfocitos T con CAR. LVII Congreso Nacional de la SEHH/Ponencias. 2015. [Consultado en Mayo 2017]. 174-178.
11. Maus, M. and Levine, B. Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy for the Community Oncologist. The Oncologist. 2016. [Consultado en Mayo 2017] 21(5): 608-617.
12. Stephan A. Grupp, Michael Kalos, David Barrett, Richard Aplenc, David L. Porter, Susan R. Rheingold et al. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. N Engl J Med. 2013. [Consultado en Mayo 2017] 368:1509-1518.
13. Alfonso Quintás-Cardama. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for B-cell malignancies. LVIII Congreso Nacional de la SEHH/Ponencias. 2016. [Consultado en Mayo 2017]. 63-67.
14. Yao W, Wen-ying Z, Qing-wang H, Yang L, Han-ren D, Ye-lei G, et al. Effective response and delayed toxicities of refractory advanced diffuse large B-cell lymphoma treated by CD20-directed chimeric antigen receptor-modified T cells. Clinical Immunology. 2014;155:160-75.
15. Sarah J. Nagle, Alfred L. Garfall, Edward A. Stadtmauer. The promise of chimeric antigen receptor engineered T cells in the treatment of hematologic malignancies. Cancer J. 2016; 22(1):27-33.
16. Marco L Davila, Craig Sauter, Renier Brentjens. CD19-targeted T cells for hematologic malignancies: clinical experience to date. Cancer J. 2015; 21(6): 470-474.
17. Hilde Almasbak, Tanja Aarvak, Mohan C. Vermuri. CAR T cell therapy: a game changer in cancer treatment. Journal of Immunology Research. 2016. 1-10
18. Karen Weintraub. Las defensas contra el cáncer. Investigación y Ciencia. Junio 2016. N°477: 19-26.